



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12M 1/12, B01D 39/00 C12N 15/10	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/11218 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Juni 1993 (10.06.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02774 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Dezember 1992 (01.12.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 39 664.2 2. Dezember 1991 (02.12.91) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DIA-GEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Straße 4, D-4010 Hilden (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : COLPAN, Metin [DE/DE]; Uhlandstraße 4, D-4300 Essen-Kettwig (DE).	(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw. ; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-5000 Köln 1 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	

(54) Title: **METHOD AND DEVICE FOR THE ISOLATION OF CELL COMPONENTS, SUCH AS NUCLEIC ACIDS, FROM NATURAL SOURCES**

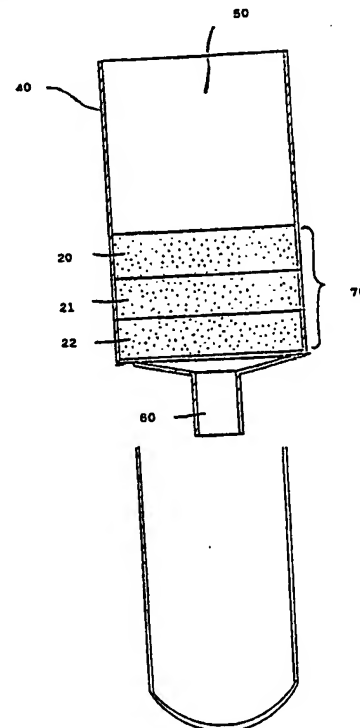
(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ISOLIERUNG VON ZELLINHALTSSTOFFEN WIE NUKLEINSÄUREN AUS NATÜRLICHEN QUELLEN**

(57) Abstract

Described is a method of isolating cell components, such as nucleic acids, from natural sources by filtering a sample of the digested natural sources such as cells or cell fragments. The method is characterized in that the sample is passed through a filter, the pore size of which decreases in the direction of flow of the sample through the filter.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Isolierung von Zellinhaltsstoffen wie Nukleinsäuren aus natürlichen Quellen durch Abtrennung der aufgeschlossenen natürlichen Quellen, wie Zellen oder Zelltrümmer, in einer Probe mit Filtration, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe einen Filter passiert, wobei die Porengröße des Filters in Fließrichtung der Probe durch den Filter abnimmt.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakische Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Sowjet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren und Vorrichtung zur Isolierung von Zellinhaltsstoffen wie Nukleinsäuren aus natürlichen Quellen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Inhaltsstoffen, wie Nukleinsäuren aus natürlichen Quellen durch Abtrennung der aufgeschlossenen natürlichen Quellen wie Zellen oder Zelltrümmer in einer Probe durch Filtration sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Bei der Präparation von Zellinhaltsstoffen, insbesondere von Nukleinsäuren, stellt sich oft das Problem, die aufgeschlossenen natürlichen Quellen, aus denen diese Inhaltsstoffe stammen von den gelösten Stoffen zu trennen. Die Abtrennung der Zellen oder Zelltrümmer erfolgt mittels Zentrifugation, wobei sich die größeren Zelltrümmer oder Zellen als Pellet im Zentrifugationsröhrchen abscheiden. Die Zellinhaltsstoffe finden sich dann im Überstand und können pipettiert werden. An sich einfachere Filtrationsverfahren konnten sich insbesondere bei der Präparation von Nukleinsäuren nicht durchsetzen, da die aufgeschlossenen Zellen oder deren Bruchstücke entweder durch die zu grobporige Filter durchlaufen und somit für Trübungen und Verunreinigungen im Filtrat sorgen oder bei Verwendung von Filtern mit entsprechenden engen Poren es jedoch zwangsläufig zur Verstopfung der Filter kommt, so daß eine sinnvolle Präparation der Zellinhaltsstoffe nicht mehr möglich ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt mithin das Problem zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen und eine Vor-

richtung zu schaffen, mit deren Hilfe Zentrifugations-schritte zur Präparation von Zellinhaltsstoffen aus natürlichen Quellen wie Zellen vermieden werden können durch einfacher zu handhabenden Filtrationsschritten.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird gelöst durch ein Verfahren gemäß den Merkmalen des Anspruchs 1. Die sich daran anschließenden Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist die Merkmale des Anspruchs 10 auf. Die sich daran anschließenden Unteransprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Um Inhaltsstoffe aus Zellen zu isolieren, werden diese überlicherweise zunächst aufgeschlossen. Bei der Präparation von Nukleinsäuren müssen die Zellen beispielsweise zunächst durch die Verwendung von Enzymen, wie z. B. Proteinase K, Lysozym und Detergenzien wie SDS, Brij, Triton X 100, Twen 20, DOC und Chemikalien wie Natriumhydroxid, Guanidin-Hydrochlorid und Guanidin-Isouthiocyanat aufgeschlossen werden. Danach wird das so aufbereitete Probenmaterial einer Filtration unterworfen, wobei die Porengröße des zur Filtration zur Anwendung kommenden Filters in Fließrichtung der Probe abnimmt.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Fluß der Probe bei der Filtration durch Anlegen eines Überdrucks oder Unterdrucks erleichtert werden. Durch die Konfiguration der Porengröße des Filters ist jedoch auch ein Durchgang der zu filtrierenden Probe durch den Filter, allein getrieben durch die Schwerkraft, möglich. Desweiteren kann auch, zur Beschleunigung des Passierens der Probe durch den Filter, die Probe durch Zentrifugation durch den Filter befördert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere zur Präparation von Plasmid-DNA oder genomischer DNA mit einer Größe von 1 bis 50 Kb geeignet.

Als Filter, die im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, kommen insbesondere solche aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, Polytetrafluoroethylen, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde, z. B. Cellit oder Silicagel, verwebten oder verklebten Vliesen aus Polypropylen, Polyester, Glasfasern und Silica sowie Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier oder Kombinationen davon in Betracht.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden gleichzeitig mehrere Proben aufgearbeitet und durch entsprechende Vorrichtungen, die in vorteilhafter Weise an Mikrotitrationssysteme adaptiert sind, geführt.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens besteht aus einem vorzugsweise zylindrischen Hohlkörper 40 mit Einlaß- und Auslaßöffnung 50, 60 sowie einer Filtrationseinrichtung 70, die im Hohlkörper 40 angeordnet ist. Zur Fixierung der Filtrationseinrichtung 70 können übliche Befestigungsmittel dienen wie beispielsweise Verklebungen oder aber auch Fixierung durch Reibungskräfte, indem die Filtrationseinrichtung 70 im Hohlkörper 40 eingeklemmt ist.

Die erfindungsgemäß Vorrichtung besteht aus mindestens einem Filter mit abnehmender Porengröße, in Richtung der Auslaßöffnung 60 gesehen. Die Figur 1 zeigt eine besonders bevorzugte Variante der erfindungsgemäßen Vorrichtung, indem im vorzugsweise zylindrischen Hohlkörper 40 die Filtrationseinrichtung 70 aus einer dreilagigen Schicht gestaltet ist. Die obere Schicht 20 kann dabei

vorzugsweise Porengrößen von 100 bis 300 μm , die zweite Schicht eine Porengröße von 30 bis 100 μm und die dritte Schicht eine Porengröße von 5 bis 30 μm aufweisen. Als Materialien, aus denen die einzelnen Schichten bestehen können, kommen insbesondere solche aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, Polytetrafluoroethylen, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteter Diatomeenerde, z. B. Cellit oder Silicagel, verwebten oder verklebten Vliesen aus Polypropylen, Polyester, Glasfasern und Silica sowie Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier oder Kombinationen davon in Frage.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann beispielsweise die Filterschicht 20, 21 aus einem anorganischen Material mit der angegebenen Porengrößenabstufung bestehen, wohingegen die Filterschicht 22 auch aus Papier bestehen kann.

Es kann vorteilhaft sein, eine zusätzliche Schicht 23 in dem Hohlkörper 40 anzuordnen und zwar oberhalb der Schicht 20 oder unterhalb der Schicht 22, die ein vorzeitiges Eindringen der zu filtrierenden Lösung in den Filter oder das Austreten der Lösung aus der erfindungsgemäßen Vorrichtung verhindert. Es ist jedoch ebenso möglich, die Schicht 20 oder Schicht 22 als poröse, hydrophobe Schicht auszubilden. Ist die hydrophobe Trennschicht 23 oberhalb der Trennschicht 20 angeordnet, ist es vorteilhaft, wenn die Porengröße dieser Trennschicht nicht kleiner als diejenige der darunterliegenden Schicht 20 ist. Dieses Erfordernis ist bei der anderen Konfiguration, wobei die hydrophobe Trennschicht unterhalb der Schicht 20 angeordnet ist, nicht so kritisch.

Die Figuren 2 a) und 2 b) zeigen die entsprechenden Konfigurationen mit hydrophober Trennschicht gemäß der bevorzugten Vorrichtung nach Figur 1.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Vorrichtung mit weiteren zur Nukleinsäurepräparation notwendigen Instrumenten kombinierbar und zwar solchen, wie sie in der parallelen Anmeldung P 41 39 664 näher beschrieben sind.

In der P 41 27 276 sind z. B. auch entsprechende Instrumente beschrieben. Der Anionenaustauscher ist in eine Membran eingebettet (3M Empore-Membran). Diese Systeme sind unter der Bezeichnung QIAwell handelsüblich.

Die Figur 3 zeigt eine Anordnung, in dem die erfindungsgemäße Vorrichtung, bestehend aus einem dreilagigen Filter 20, 21, 22, auf eine Kartusche aufgesteckt ist, in der sich zwischen zwei Einrichtungen 5 und 6 ein Anionenaustauschermaterial 10 angeordnet befindet. Die aufzutrennende Probe wird auf die Filterschicht 20 geschichtet, der Filteraufsatz auf die Kartusche (im wesentlichen ein ebenfalls zylindrischer Hohlkörper) 1 (Extraktions säule) aufgesteckt. Danach passiert die zu trennende Lösung die Filtereinrichtung 70, gegebenenfalls durch Anlegen eines leichten Über- oder Unterdruckes und tropft in den darunterliegenden Behälter (Extraktionssäule), in denen das Anionenaustauschermaterial 10 angeordnet ist. Unter geeigneten Pufferbedingungen (niedriger Salzkonzentration) binden dann beispielsweise Nukleinsäuren an dem Anionenaustauschermaterial. Die Zelltrümmer befinden sich in dem erfindungsgemäßen Filteraufsatz 40, wohingegen die interessierenden Nukleinsäuren an den Ionenaustauschern adsorbiert vorliegt. Nach Verwerfen des Filterkuchens in der Filtrationseinrichtung 40 kann dann der zylindrische Hohlkörper 1 mit den darin befindlichen Nukleinsäuren weiter verarbeitet werden.

Die Figur 4 zeigt eine analoge Situation wie Figur 3 mit dem erfindungsgemäßen Filteraufsatz 40, wobei ein zwei-

- 6 -

lagiger Filter verwendet wird, der durch eine hydrophobe Trennschicht 23 abgeschlossen wird. Die Auslaßöffnung 60 der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird vorzugsweise so dimensioniert, daß sie in die entsprechende Kartusche 1 des Nukleinsäure adsorbierenden Materials eingeschoben werden kann und dort aufgrund von Reibungskräften fixiert ist.

Die in den Figuren 1, 2 a) und 2 b) gezeigten Filtrationseinrichtungen können ebenfalls auf eine Kartusche aufgesteckt werden, in der ein Material angeordnet ist, das Nukleinsäuren bei hohen Ionenstärken zu binden vermag. Dies sind insbesondere Materialien wie Glas, Silicagel und andere mineralische Stoffe. Eine Nukleinsäurepräparation kann dann beispielsweise unter Hochsalzbedingungen durchgeführt werden. Die entsprechend vorbereitete und aufgeschlossene Probe wird dann durch die erfindungsgemäße Filtrationseinrichtung nach einer der Konfigurationen gemäß Figuren 1, 2a) oder 2b) passiert und dann in der Figur 5 gezeigten Vorrichtung 1 an Silicagel, Glasfaser, gepreßtem Glaspulver Materialien 11 unter Bedingungen hoher Ionenstärke adsorbiert.

Die Figur 5 zeigt die erfindungsgemäße Vorrichtung mit einer Filterschicht 70, die eine asymmetrische Porengrößenverteilung, in Fließrichtung der Probe gesehen, aufweist. Dabei nimmt in Fließrichtung die Porengröße kontinuierlich oder diskontinuierlich von etwa 100 bis 500 μm auf 5 bis 30 μm ab.

Die Figur 6 zeigt eine Anordnung, in der die erfindungsgemäße Vorrichtung in einer Konfiguration ähnlich der Figur 5 auf einer Extraktionssäule angeordnet ist, in der sich ein Anionenaustauschermaterial 10 oberhalb des mineralischen Trägers 11 gemäß Figur 5 angeordnet ist. Diese Anordnung ist vorteilhaft, da die aufgeschlossene

- 7 -

Probe in der erfindungsgemäßen Vorrichtung von Zelltrümmern befreit wird und in die Extraktionssäule 1 hineintropft, um unter Niedrigsalzbedingungen an dem Anionenaustauschermaterial 10 adsorbiert zu werden. Nach dem Verwerfen des Filterkuchens kann dann die im Ionenaustauscher gebundene Nukleinsäure zunächst unter Bedingungen niedriger Ionenstärke gewaschen werden und dann unter Bedingungen hoher Ionenstärke vom Anionenaustauscher 10 eluiert werden. Daraufhin wird die unter Hochsalzbedingungen vom Anionenaustauscher eluierte Nukleinsäure vom anorganischen Material 11, beispielsweise Silicagel oder Glasfasern, adsorbiert. Nach weiteren Waschschritten kann dann durch Zugabe von beispielsweise destilliertem Wasser die RNA vom Träger 11 desorbiert und eluiert werden.

Die Figur 7 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Einrichtung, die in Form von Mikrotitrationsstreifen vorliegen kann. Die Figur 7 zeigt eine Anordnung, in der die erfindungsgemäße Vorrichtung 40, die linear hintereinander angeordnet sind und bereits auf eine entsprechende Anordnung von Kartuschen wie sie beispielsweise in Figur 3 bereits beschrieben wurde, angeordnet ist. Die hydrophobe Schicht 23 kann unter- oder oberhalb der Filtrationseinrichtung angeordnet sein.

Entsprechende Konfigurationen sind mit jeweils anderen Adsorptionsmaterialien in den Figuren 8 und 9 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Plasmid-Minipräparation

Eine 1,5 ml HB 101 E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,6 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 1 überführt. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar Differenzdruck durch die erfindungsgemäße Filtervorrichtung in ein 2 ml Röhrchen gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die DNA im Filtrat wird mit 0,5 Volumen Iso-Propanol ausgefällt und das Alkoholpellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Wenn die erfindungsgemäße Filtrationsvorrichtung im Microtiter-Format ausgelegt wird, können gleichzeitig bis zu 96 Proben aufgearbeitet werden. Somit läßt sich die Zeit für die Präparation von 96 Proben von 240 min auf 15 min reduzieren.

Beispiel 2

Plasmid-Minipräparation an Anionenaustauscher

Eine 1,5 ml HB 101 E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 3. überführt. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar Differenzdruck durch die erfindungsgemäße Filtervorrichtung gesaugt und auf eine Anionenaustauschersäule filtriert. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Das Filtrat wird vollständig durch die Extraktionssäule gesaugt oder gedrückt, um eine Adsorption der DNA zu erreichen. Die Extraktionssäule wird anschließend 2 mal mit 1 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkoholpellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Beispiel 3

Plasmid-Minipräparation mit Zell-Lyse im Filter

Eine 1,5 ml HB 101 E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 4 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung nach Abb. C gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die hydrophobe Trennschicht wird ein vorzeitiges Austreten der Lysereagenzien durch die Filterschicht vermieden, und eine Zell-Lyse direkt in der Filtereinheit ermöglicht. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar Differenzdruck durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrations-schichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkoholpellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Beispiel 4

Plasmid-Minipräparation an Silicagel

Eine 1,5 ml HB 101 E. coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,5 ml 4,5 M Guanidin-HCl, 0,75 M K-Acetat, pH 5,5 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung nach Figur 5 wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung in ein Probenröhrchen filtriert. Im Probenröhrchen befindet sich 10 mg eines mineralischen Trägers, z. B. Silicagel oder Glas mit einer Partikelgröße von 1 - 5 µm in 0,1 ml 4,5 M Guanidin-HCl, 0,75 M K-Acetat, pH 5,5, der in der Lage ist, die DNA unter diesen Bedingungen zu adsorbieren. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen.

Das Filtrat mit der DNA in Hochsalz und dem mineralischen Träger in Hochsalz wird 1 - 5 ml inkubiert, um eine Adsorption der DNA zu erreichen. Die Suspension wird 5 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Suspension wird in 1 ml 80% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 resuspendiert und abermals abzentrifugiert, und das Pellet mit der gebundenen DNA 5 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Zum Schluß wird

- 12 -

die DNA mit 100 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie z. B. Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

Beispiel 5

Plasmid-Minipräparation an Glasmembran

Eine 1,5 ml HB 101 E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 μ g/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,5 ml 4,5 M Guanidin-HCl, 0,75 M K-Acetat, pH 5,5 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung nach Figur 5 wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Das Filtrat mit der DNA in Hochsalz wird durch die Silicagelextraktionssäule mit einer z. B. 2 mm dicken Glasfasermembran gesaugt oder gedrückt um eine Adsorption der DNA zu erreichen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 1 ml 6,5 M Guanidin-HCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die Extraktionssäule wird mit 2 mal 1 ml 80% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 und mit 1 mal 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und die Ethanolspuren abgesaugt. Zum Schluß

- 13 -

wird die DNA mit 10 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Rörchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie z. B. Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

Beispiel 6

Plasmid-Minipräparation an Anionenaustauscher/Glasmembran

Eine 1,5 ml HB 101 E. coli Kultur mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 μ g/ml RNase A resuspendiert und in eine Vorrichtung nach Figur 6 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die hydrophobe Trennschicht wird ein vorzeitiges Austreten der Lyseagenzien durch die Filterschicht vermieden und eine Zell-Lyse direkt in der Filtereinheit ermöglicht.

Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar Differenzdruck durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15%

- 14 -

Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO₄ 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 5% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 von der Anionenaustauscherschicht (10) eluiert und dabei direkt an die Silicagelschicht (11) gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 2 mal 0,8 ml 80% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H₂O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die Proben mit je 100 µl 1 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert in in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie z. B. Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

Beispiel 7

Plasmid-Minipräparation in einem "Mikrotitrationsstreifen"

8 mal 1,5 ml XL Blue E. coli Kulturen mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zellpellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Vorrichtung nach Figur 7 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis

- 15 -

inkubiert. Die ganze Vorrichtung auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 8 mal 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

Beispiel 8

Plasmid-Minipräparation in einem "Mikrotitrationsstreifen"

8 mal 1,5 ml LX Blue E.coli Kulturen mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zell-pellets werden in 0,25 ml 50 ml Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Vorrichtung nach Figur 8 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird 0,5 ml 4,5 M Guanidin-HCl, 0,75 M K-Acetat, pH 5,5 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung nach Abb. G wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung

- 16 -

gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Das Filtrat mit der DNA in Hochsalz wird durch die Silicagelextraktionssäule mit einer 2 mm dicken Glasfasermembran gesaugt oder gedrückt um eine Adsorption der DNA zu erreichen. Die Extraktionssäule wird 1 mal mit 1 ml 6,5 M Guanidin-HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die Extraktionssäule wird mit 2 mal 1 ml 80% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und die Ethanolspuren durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie z. B. Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

Beispiel 9

Plasmid-Minipräparation in einem "Mikrotitrationsstreifen" mit Ionenaustauscher und Glasmembran

8 mal 1,5 ml XL Blue E. coli Kulturen mit pUC 18 Plasmid-DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zellpellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Vorrichtung nach Figur 9 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen.

- 17 -

Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteinen zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 5% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht eluiert und dabei direkt an die Silicagelschicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 8 mal 0,8ml 80% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 8 mal 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H₂O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 bis 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 8 Proben mit je 10 µl 1 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert.

Beispiel 10

Präparation von genomischer DNA

100 mg Lebergewebe von einer Ratte werden mit einem Skalpell in 1 mm große Stücke zerkleinert und in 1 ml 500 mM Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 0,1 ml Proteinase K (10 mg/ml) 2 Stunden bei 50°C lysiert. Das Lysat wird in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 9 überführt. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-

- 18 -

kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken und den denaturierten Proteinen verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO₄, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO₄, 5% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 von der Anionenaustauscherschicht (10) eluiert und dabei direkt an die Silicagelschicht (11) gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 8 mal 0,8 ml 80% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 8 mal 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die Probenröhrchen werden zur Entfernung der Hochsalzlösung mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H₂O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert.

Beispiel 11

Präparation von genomischer DNA mit Filtration und Glasmembran

100 mg Lebergewebe von einer Ratte werden mit einem Skalpell in 1 mm große Stücke zerkleinert und in 1 ml 500 mM Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 0,1 ml Proteinase K (10 mg/ml) zwei Stunden bei 50°C lysiert. Danach wird 0,5 ml 5 M Guanidin-HCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7

oder 0,25 ml Ethanol zugegeben und gemischt, um die Probe auf Adsorptionsbedingungen an das Glas einzustellen. Die ganze Vorrichtung nach Figur 9 wird auf eine Vakuumkammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar- 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrations-schichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken verworfen. Das Filtrat mit der DNA in Hochsalz oder in Ethanol wird durch die Silica-geextraktionssäule mit einer 2 mm dicken Glasfaser-membran gesaugt oder gedrückt um eine Adsorption der DNA zu erreichen. Die Extraktionssäule wird 1 mal mit 1 ml 5 M Guanidin-HCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die Extraktionssäule wird mit 2 mal 1 ml 80% Ethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und die Ethanol-spuren durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte genomische DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie z. B. Restriktionsspaltung, Markierung oder Amplifizierung eingesetzt werden.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Isolierung von Zellinhaltsstoffen wie Nukleinsäuren aus natürlichen Quellen durch Abtrennung der aufgeschlossenen natürlichen Quellen, wie Zellen oder Zelltrümmer, in einer Probe mit Filtration, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe einen Filter passiert, wobei die Porengröße des Filters in Fließrichtung der Probe durch den Filter abnimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Fluß der Probe durch den Filter durch Anlegen von Überdruck, Unterdruck oder Schwerkraft oder durch Zentrifugation erhöhte Schwerkraft sowie Kombination dieser Maßnahmen unterstützt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei die Nukleinsäure Plasmid-DNA oder genomische DNA ist mit einer Größe von 1 bis 50 Kb (Kilobasenpaare).
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Proben eine aus mehreren Schichten aufgebauten Filter passiert, wobei ausgehend von einer bestimmten Porengröße, die jeweils folgenden Schichten eine geringe Porengröße aufweisen.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe einen aus einer Schicht bestehenden Filter passiert, dessen Porengröße in Fließrichtung der Probe abnehmen.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße im

- 21 -

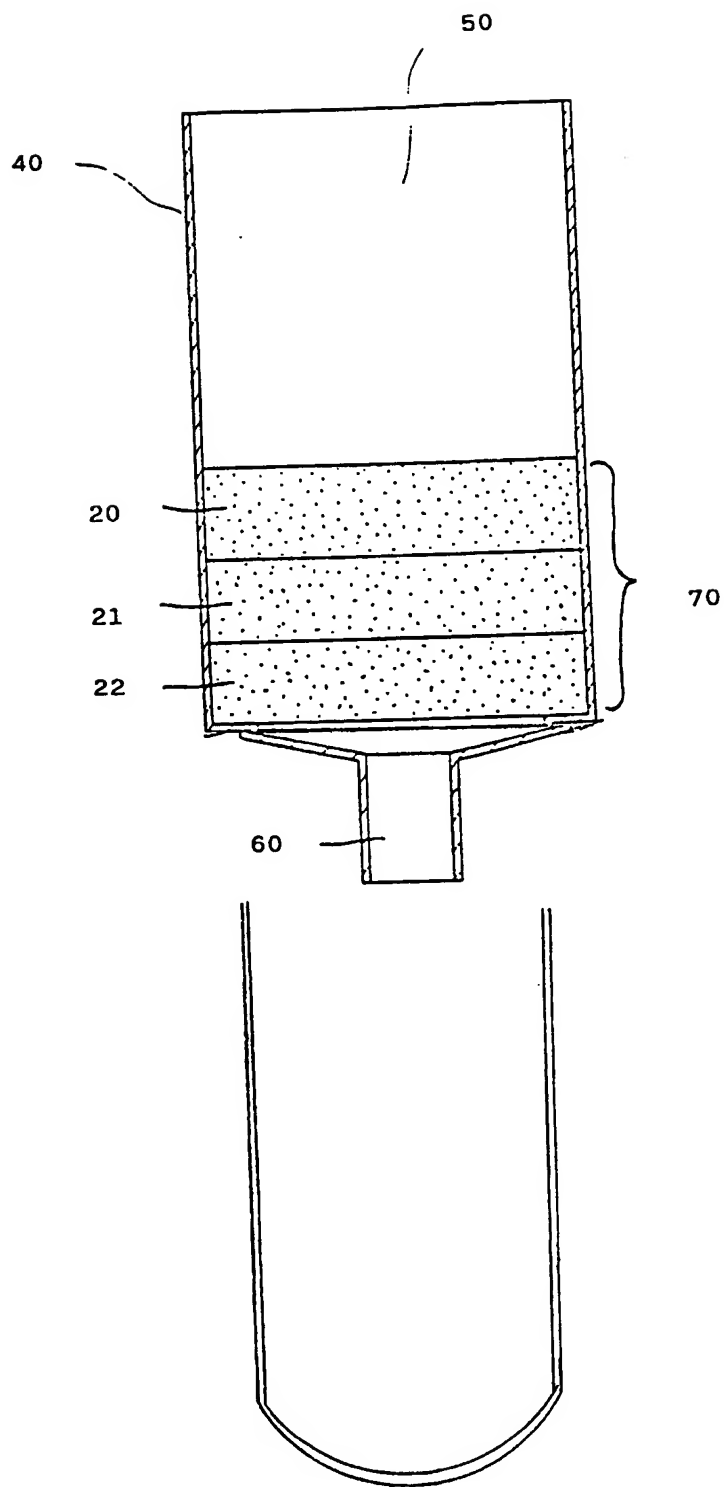
Bereich von 5 μm bis 500 μm liegt, mit einer Dicke der gesamten Filterschicht von 0,1 mm bis 10 mm.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe eine dreilagige Filterschicht passiert, wobei die erste Filterschicht eine Porengröße von 100 bis 200 μm , die zweite Filterschicht eine Porengröße von 30 bis 100 μm und die dritte Filterschicht eine Porengröße von 5 bis 30 μm aufweist.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Filterschichten oder der Filter aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, Polytetrafluoroethylen, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteten Diatomeenerde, z. B. Cellit oder Silicagel, verwebten oder verklebten Vliesen aus Polypropylen, Polyester, Glasfasern und Silica sowie Papier, gepreßtem Papier, Vliesen aus Papier aufgebaut sind.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei gleichzeitig mehrere Proben aufgearbeitet werden in Vorrichtungen, die an Mikrotitrationsverfahren adaptiert sind.
10. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei in einem vorzugsweise zylindrischen Hohlkörper 40 mit Einlaß- und Auslaßöffnung (50, 60) eine Filtrationseinrichtung (7) angeordnet ist.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtrationseinrichtung (70) aus einem Filter mit abnehmender Porengröße, in Richtung der Auslaßöffnung (60) gesehen, besteht.

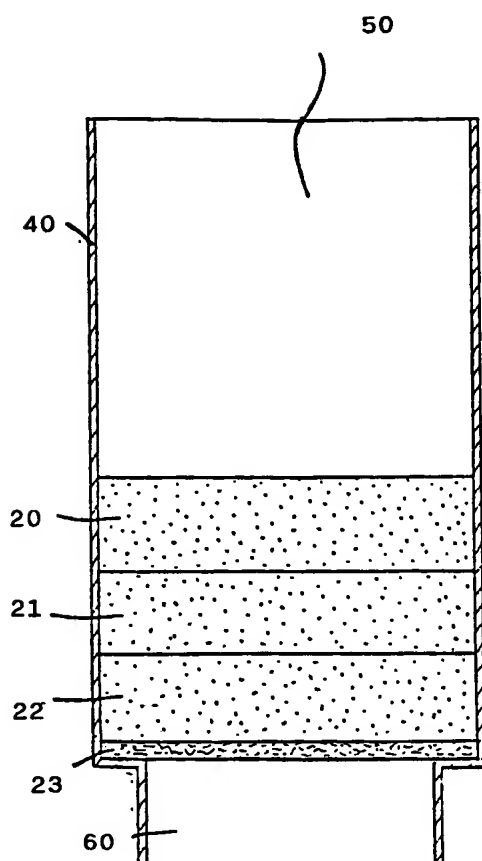
12. Vorrichtung nach Anspruch 10 und/oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtrationseinrichtung (70) aus einer mehrlagigen Filterschicht besteht.
13. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtrationseinrichtung eine Porengröße im Bereich von 5 μm bis 500 μm aufweist, in einer Dicke der gesamten Filterschicht von 0,1 bis 10 mm.
14. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß in dem zylindrischen Hohlkörper (40) eine hydrophobe Trennschicht (23) angeordnet ist.
15. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtrationseinrichtung mit weiteren zur Präparation von Nukleinsäuren notwendigen Instrumenten, insbesondere zur Mikrotitration geeigneten Instrumenten, kombinierbar ist.

- 1 / 8 -

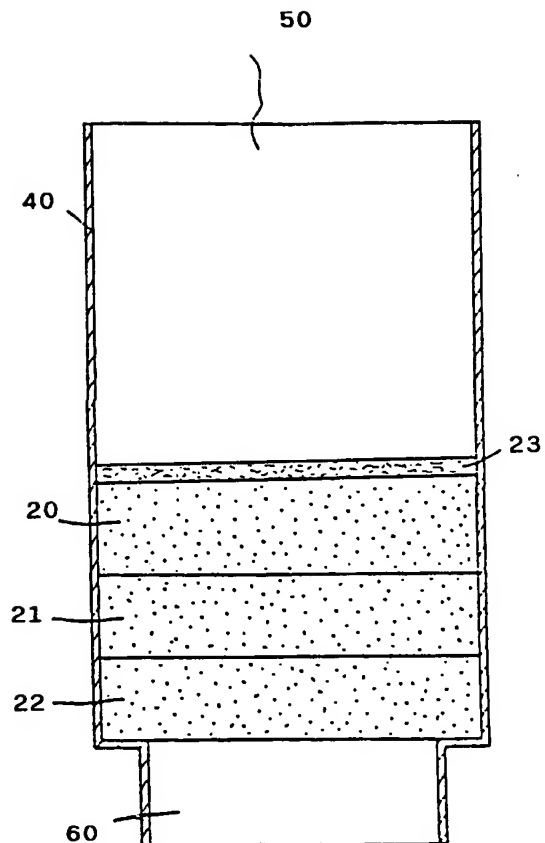
FIGUR 1



- 2 / 8 -

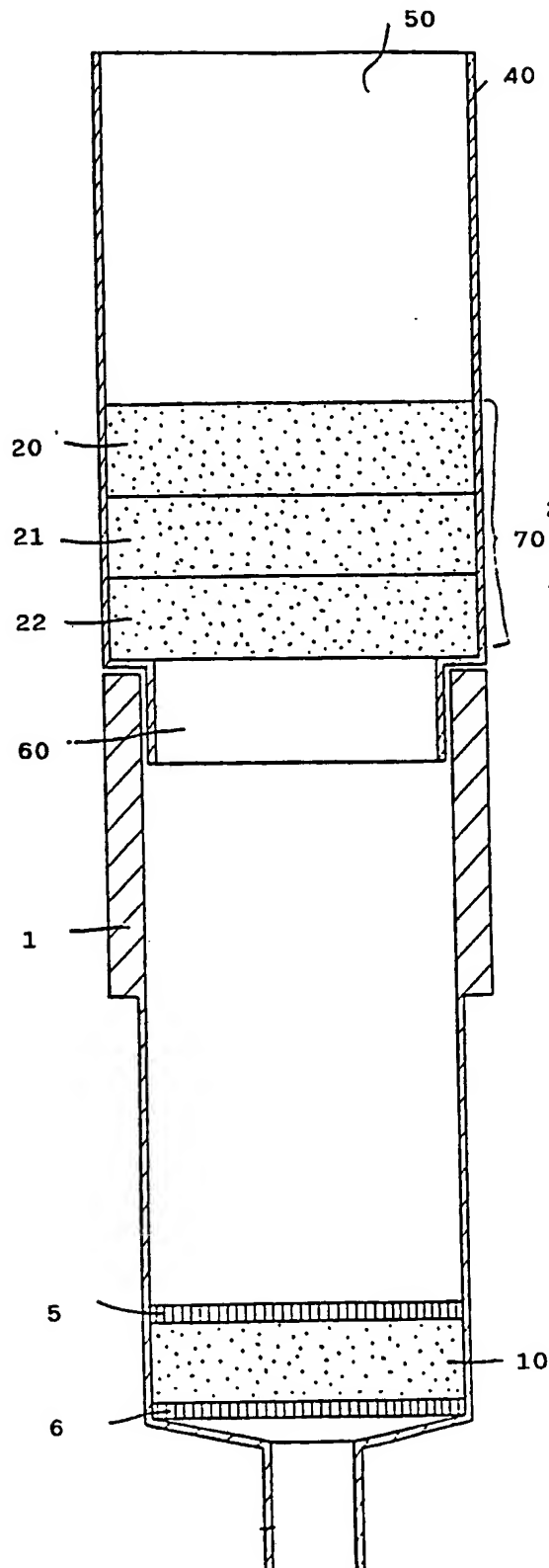


FIGUR 2a

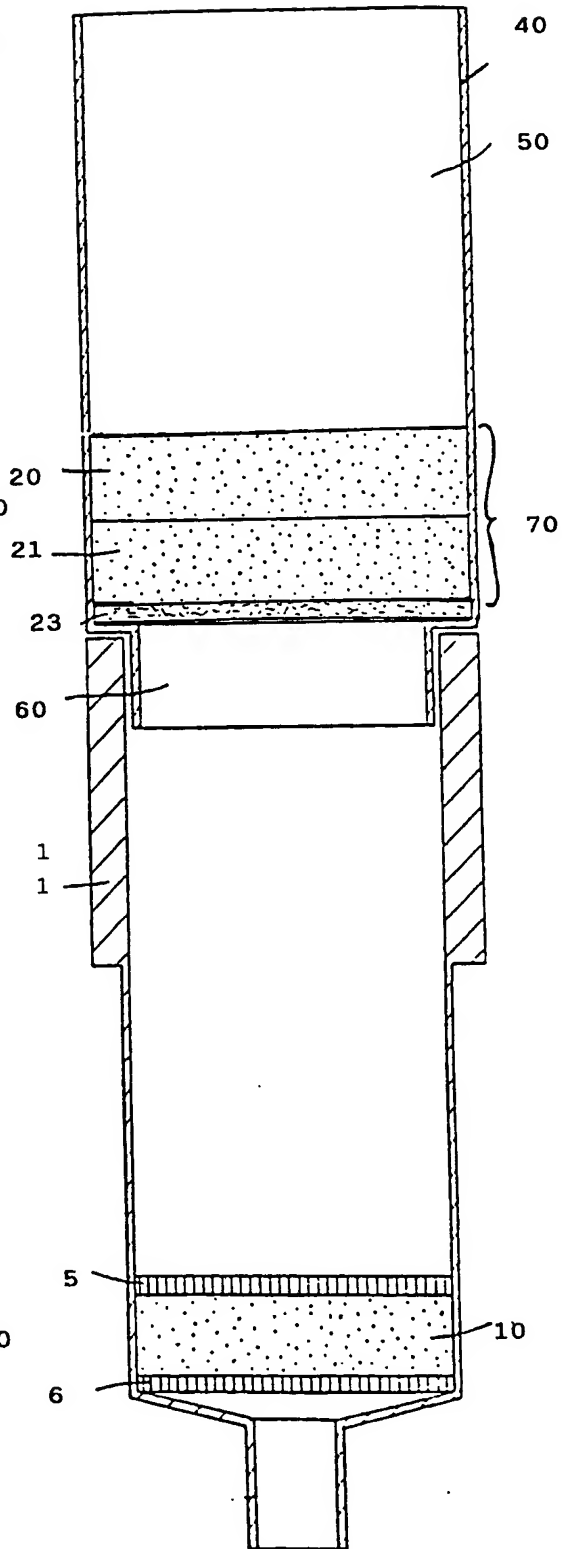


FIGUR 2b

- 3 / 8 -

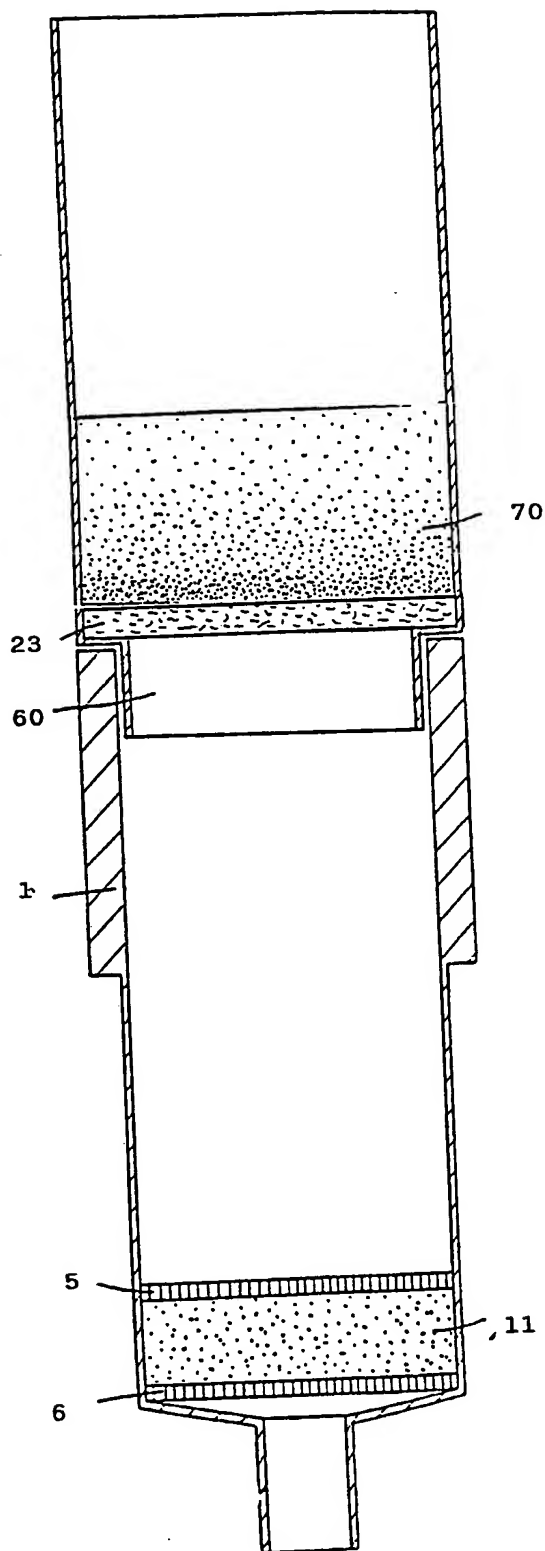


FIGUR 3



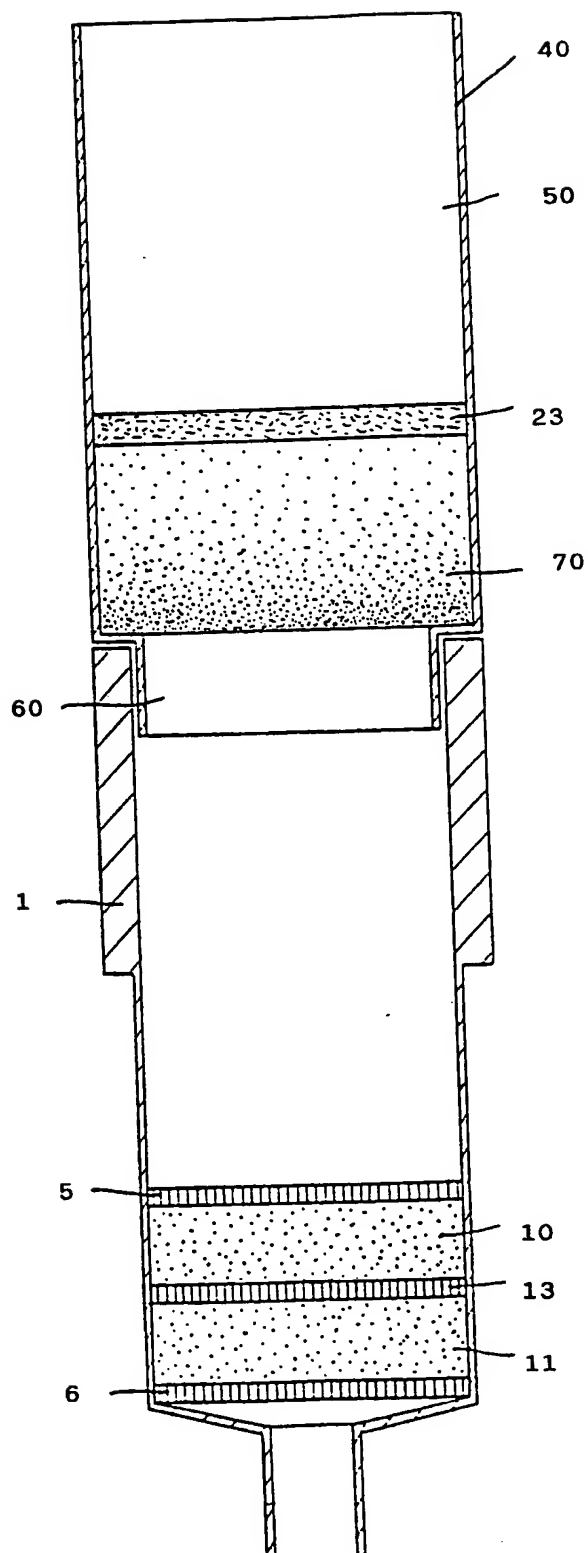
FIGUR 4

FIGUR 5



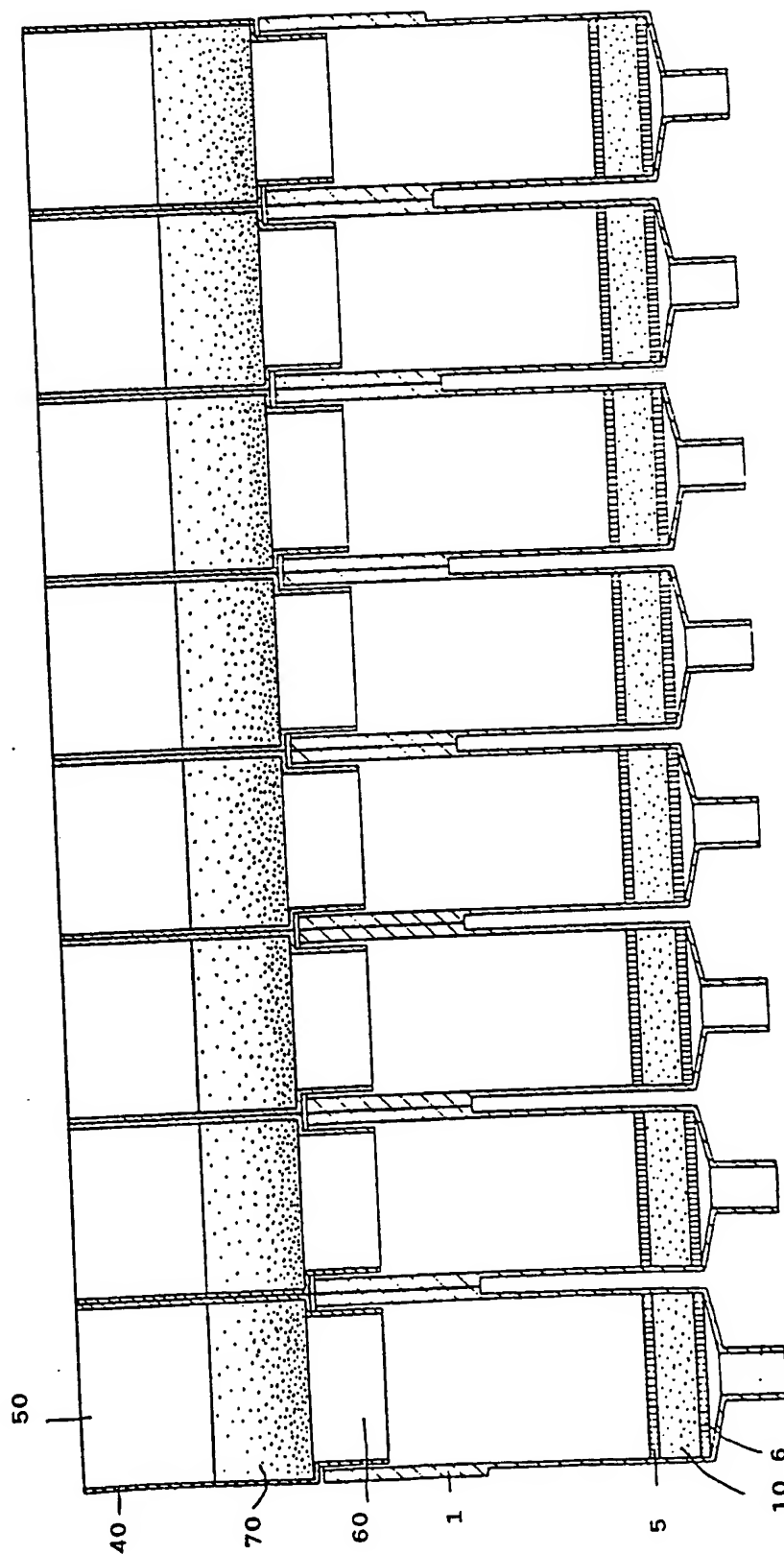
- 5 / 8 -

FIGUR 6



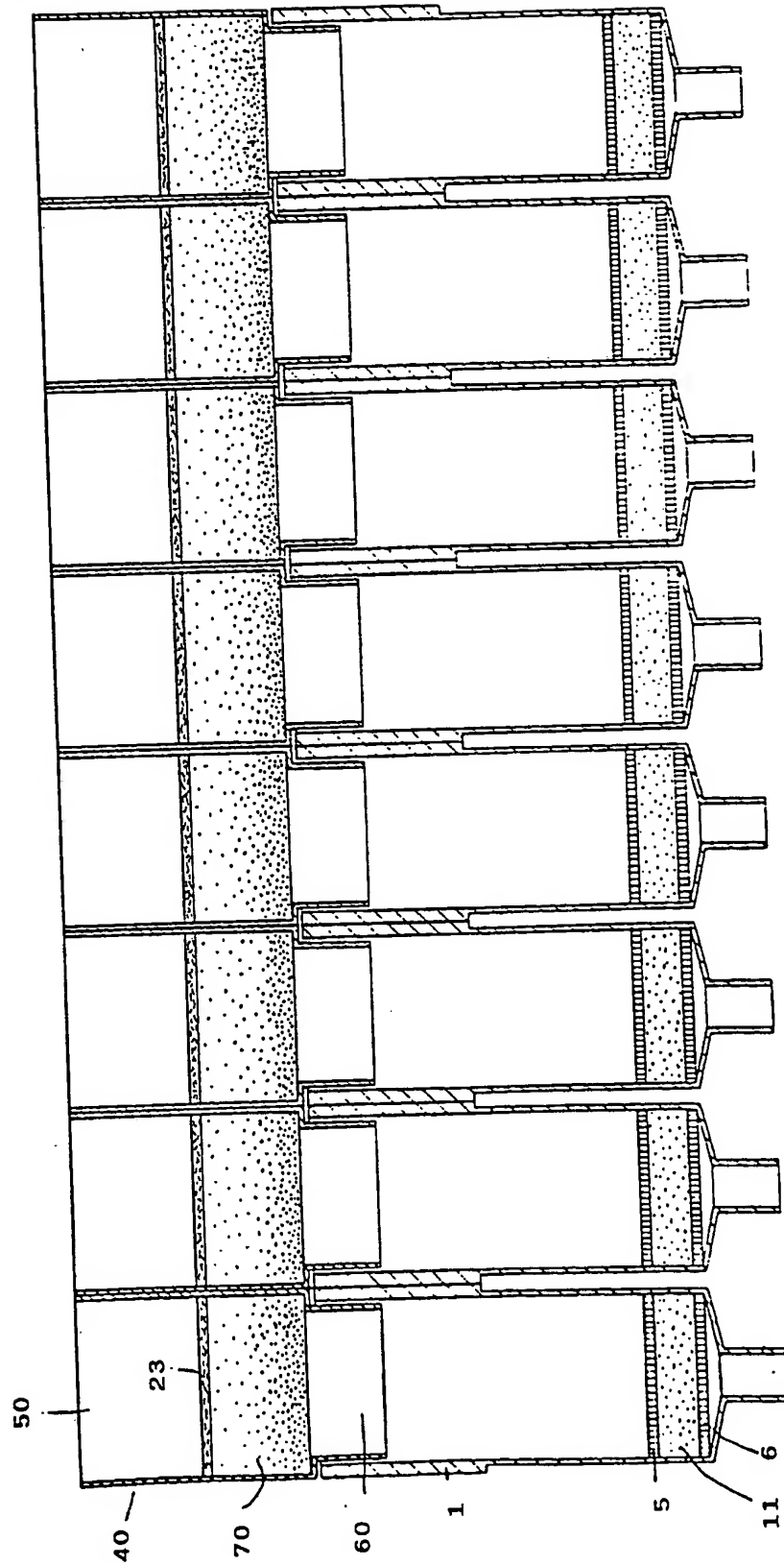
- 6 / 8 -

FIGUR 7

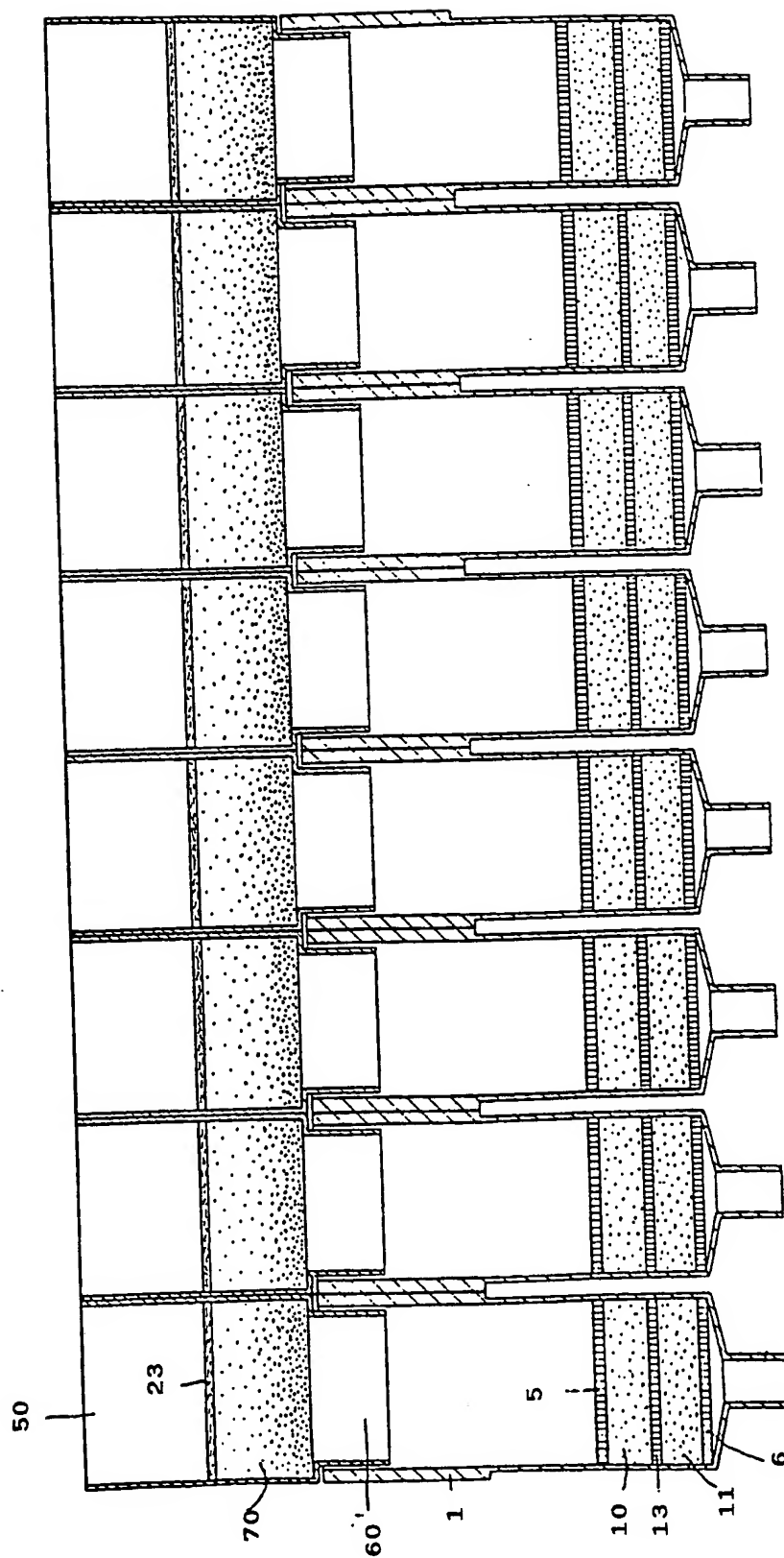


ERSATZBLATT

FIGUR 8



FIGUR 8



ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/2774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁵ C12M1/12; B01D39/00; C12N15/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁵ C12M; B01D, C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,9 200 132 (COULTER CORPORATION) 9 January 1992 see the whole document	1 2-15
P,Y		2-15
P,Y	EP,A,0 471 910 (TOTO LTD.) 26 February 1992 see column 4, line 15 - line 24 see column 6, line 9 - line 17; claims; figures	1-15
A	EP,A,0 431 905 (TOSOH CORPORATION) 12 June 1991 see the whole document	1,4-5, 8-10
A	US,A,2 114 748 (P. PRAUSNITZ) 19 April 1938	
-/--		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 February 1993 (25.02.93)		Date of mailing of the international search report 15 March 1993 (15.03.93)
Name and mailing address of the ISA. European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer: Telephone No

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02774

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US,A,4 935 142 (S. STERNBERG) 19 June 1990 see column 1, line 6 - line 41 see column 6, line 56 - line 66; claims, figures</p>	1, 7-8-10

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9202774
SA 67174

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 25/02/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9200132	09-01-92	US-A- 5076933 AU-A- 8215091	31-12-91 23-01-92
EP-A-0471910	26-02-92	JP-A- 4100505 US-A- 5098571	02-04-92 24-03-92
EP-A-0431905	12-06-91	JP-A- 3180182	06-08-91
US-A-2114748		None	
US-A-4935142	19-06-90	None	

I. KLASSEIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC
 Int.Kl. 5 C12M1/12; B01D39/00; C12N15/10

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole
Int.Kl. 5	C12M ; B01D ; C12N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
P,X	WO,A,9 200 132 (COULTER CORPORATION) 9. Januar 1992 siehe das ganze Dokument	1
P,Y	---	2-15
P,Y	EP,A,0 471 910 (TOTO LTD.) 26. Februar 1992 siehe Spalte 4, Zeile 15 - Zeile 24 siehe Spalte 6, Zeile 9 - Zeile 17; Ansprüche; Abbildungen	2-15
A	---	1-15
A	EP,A,0 431 905 (TOSOH CORPORATION) 12. Juni 1991 siehe das ganze Dokument	1-15
A	---	1,4-5, 8-10
	US,A,2 114 748 (P. PRAUSNITZ) 19. April 1938	---
	---	---

⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25.FEBRUAR 1993

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

15. 03. 93

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten

BEVAN S.R.

DL EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		Betr. Anspruch Nr.
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	
A	US,A,4 935 142 (S.STERNBERG) 19. Juni 1990 siehe Spalte 1, Zeile 6 - Zeile 41 siehe Spalte 6, Zeile 56 - Zeile 66; Ansprüche; Abbildungen -----	1,7-8,10

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9202774
SA 67174

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

25/02/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9200132	09-01-92	US-A- 5076933 AU-A- 8215091	31-12-91 23-01-92
EP-A-0471910	26-02-92	JP-A- 4100505 US-A- 5098571	02-04-92 24-03-92
EP-A-0431905	12-06-91	JP-A- 3180182	06-08-91
US-A-2114748		Keine	
US-A-4935142	19-06-90	Keine	

EPO FORM P013

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82